中国生物工程杂志　China Biotechnology,2017,37(7):97-104

DOI:10.13523/j.cb.20170716

基于 IRES 序列的多基因共表达载体构建*

田聪慧[1]　谢雪梅[1]　李　英[1]　尹晓东[2]　韩　军[1]　李　军[1]**
(1 聊城大学药学院生物制药研究院　聊城　252000　2 宜兴市赛尔生物科技有限公司　宜兴　214200)

摘要　目的:构建一个 IRES 序列介导的多基因共表达载体,实现两个目的基因和筛选标记基因共用一个启动子高效表达,提高多基因稳定共表达细胞株的筛选效率。方法:以实验室前期构建的载体 pLV-MCS-Puro 为骨架,设计并全基因合成双基因克隆表达元件,连接到骨架载体,构建多基因共表达载体 pLV-2MCS-Puro,以 DsRed2 和 EGFP 荧光蛋白基因验证该载体用于多基因稳定共表达细胞株筛选的效率。结果:成功构建了 pLV-2MCS-Puro 载体以及 DsRed2 和 EGFP 共表达重组质粒 pLV-DsRed2-EGFP-Puro。瞬时转染实验证明该载体能介导多基因共表达。抗性筛选获得了 MDCK 和 HeLa 两种细胞的多基因稳定共表达细胞池。细胞池涂片荧光显微镜观察和计数表明抗性细胞池 DsRed2 和 EGFP 双阳率接近 100%。基因组和转录水平 PCR 及蛋白质免疫印迹实验表明,DsRed2 和 EGFP 稳定整合到抗性细胞基因组,并且两种蛋白质表达水平较为一致。结论:成功构建了多基因共表达载体 pLV-2MCS-Puro,实现了两个目的基因和抗性基因串联共表达,并且具有高效的多基因稳定共表达细胞株筛选效率。该载体在研究蛋白质相互作用及工程细胞构建等方面具有一定的应用前景。

关键词　IRES　载体构建　基因共表达
中图分类号　Q782

科学研究中构建稳定表达细胞株,抗体工程和细胞工程领域筛选种子细胞经常需要实现两个或以上的基因稳定共表达。通常通过两个载体共转染的筛选方法来实现,然而实践中常面对以下问题:①两个载体共转染需要两种筛选标记;②两个载体的共转染效率,整合效率和目的基因的共表达效率及表达稳定性存在差异[1];③筛选标记基因与目的基因的共整合效率。以上问题为筛选合适的稳定表达细胞株在效率、时间和人工成本等方面提出了挑战。因此,有必要开发单个载体实现多基因共同表达来解决以上问题。

IRES(internal ribosome entry site)序列是于 1988 年分别由 Nahum Sonenberg 和 Eckard Wimmer 实验室在脊髓灰质炎病毒(PV)[2] 和脑心肌炎病毒(EMCV)[3] 的 RNA 基因组中发现。IRES 通常位于 RNA 病毒的 5′UTR中,允许 RNA 以 5′帽子非依赖性方式翻译[4-9]。利用 IRES 连接两个基因,在上游启动子的控制下,IRES 和两个基因转录成为同一条 mRNA,翻译时,IRES 上游基因翻译起始遵循真核生物基因的帽依赖性方式,而下游基因则通过 IRES 招募核糖体进入起始基因的翻译,实现了 IRES 序列连接的两个基因共用同一个转录单位表达[10-12]。目前,已经有较多利用 IRES 序列连接两个目的基因,实现双基因的瞬时表达或者稳定表达细胞株构建的研究[13-18]。但是使用唯一启动子,利用 2 个或以上 IRES 序列串联 2 个或者以上目的基因和抗性基因共表达,以提高多基因稳定共表达细胞株的筛选效率的研究未见报道。

本研究在实验室前期构建的慢病毒表达载体 pLV-MCS-Puro 的基础上,设计并全基因合成双基因克隆表达元件(*Bam*HI-MCS1-IRES-MCS2-IRES-*Bsi*WI),构建双基因共稳定表达筛选载体 pLV-2MCS-Puro,该载体通过两个 IRES 序列串联两组多克隆位点以及嘌呤霉素抗性基因,由上游唯一的启动子转录形成一个长的转

收稿日期:2017-02-07　　修回日期:2017-04-06
* 国家自然科学基金青年项目(81402512)、聊城市科技发展计划项目(2014GJH11)、泰山学者工程专项资助项目
**通讯作者,电子信箱:think.a@163.com

录框，进而实现外源双基因和抗性基因的共同表达，提高双基因共稳定表达细胞株的筛选效率。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 载体、菌种和细胞株 真核表达载体 pEGFP、pDsRed2 和大肠杆菌菌种 DH5α 由中山大学医药分子生物学实验室惠赠；细胞株 HEK293T、MDCK 和 HeLa 细胞购自中国科学院细胞库；表达载体 pLV-MCS-Puro 为本实验室自主构建并保种。

1.1.2 酶、试剂盒和其他试剂 质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购自 Omega 公司；限制性内切核酸酶购自 New England BioLabs 公司；DNA 聚合酶、连接酶和反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司；全基因合成和测序由上海生工生物工程有限公司完成；JetPEI™ 转染试剂购自 PolyPlus-transfection（PT）公司；基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司；RNA 提取试剂盒购自 Invitrogen 公司；DMEM 培养基、胎牛血清 FBS、胰酶购自 Gibco 公司；嘌呤霉素（puromycin）购自 TCI 公司；鼠抗 GFP 单克隆抗体、鼠抗 RFP 单克隆抗体、鼠抗 β-Tubulin 单克隆抗体和辣根过氧化酶标记的山羊抗鼠 IgG 购自美国 Abbkine 公司。

1.1.3 主要仪器 全温培养摇床购自上海新苗医疗器械制造有限公司；台式冷冻离心机购自 Eppendorf 公司；超微量紫外分光光度计购自 Implen 公司；梯度 PCR 仪、电泳槽购自 Bio-Rad 公司；成像仪购自 Uvitec 公司；洁净工作台购自北京东联哈尔仪器制造有限公司；二氧化碳培养箱购自 Thermo 公司；生物照相显微镜购自奥林巴斯公司；倒置荧光显微镜购自 Nikon 公司。

1.2 方 法

1.2.1 pLV-2MCS-Puro 载体的构建 分析骨架载体 pLV-MCS-Puro 已有的限制性酶切位点，设计两组多克隆位点，全基因合成双基因克隆表达元件（*Bam*HI-MCS1-IRES-MCS2-IRES-*Bsi*WI）（图 1A），克隆到 pUC57 载体。*Bam*HI 和 *Bsi*WI 双酶切 pUC57 载体和骨架载体 pLV-MCS-Puro，胶回收，连接 *Bam*HI-MCS1-IRES-MCS2-IRES-*Bsi*WI 与骨架载体，连接产物转化 DH5α 感受态，涂板，挑克隆，接种，提质粒，用 *Bam*HI 和 *Sbf*I 双酶切鉴定质粒，获得 pLV-2MCS-Puro 载体。

1.2.2 pLV-DsRed2-EGFP-Puro 表达载体构建 以 pEGFP 表达质粒为模板，设计 EGFP 上游克隆引物 5′CGACCGGTGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA3′ 和下游克隆引物 5′CTCCTGCAGGTTATGATCAGTTATCTAGATCCGG3′，PCR 克隆和胶回收 *EGFP* 基因片段，*Age*I 和 *Sbf*I 双酶切 *EGFP* 基因片段和载体 pLV-2MCS-Puro，胶回收后连接，转化 DH5α 感受态，涂板，挑克隆，菌落 PCR 阳性鉴定，接种，提质粒 pLV-MCS1-EGFP-Puro。以 *DsRed2* 表达质粒为模板，设计 *DsRed2* 上游克隆引物 5′TCATGCTAGCGCCATGGTGCGCTCCTCCAAGAAC3′和下游克隆 5′AGGCGCGCCCTACAGGAACAGGTGGTGGCGGC3′，PCR 克隆和胶回收，*Nhe*I 和 *Asc*I 双酶切 *DsRed2* 基因片段和载体 pLV-MCS1-EGFP-Puro。按以上克隆方法回收，连接，转化，鉴定，接种，提取重组质粒 pLV-DsRed2-EGFP-Puro。

1.2.3 细胞培养、转染和稳定表达细胞株筛选 HEK293T、MDCK 和 HeLa 细胞在 DMEM、10% FBS、5% CO_2、37℃ 条件下培养。MDCK 和 HeLa 细胞铺板 24h 后，用嘌呤霉素终浓度分别为 0.5μg/ml、1μg/ml、2μg/ml、4μg/ml、6μg/ml、8μg/ml、10μg/ml 的 10% FBS DMEM 培养，以 3～4 天以内能杀死所有细胞的最小浓度配制稳定表达细胞株筛选培养基。细胞转染使用 JetPEI 试剂盒完成，转染 36h 后，换筛选培养基培养，3～4天更换一次筛选培养基，直至克隆形成，获得耐药细胞池（pool）。瞬时转染爬片的 HEK293T 细胞荧光显微镜观察质粒的转染效率和目的基因表达情况，筛选得到的 MDCK 和 HeLa 耐药细胞池消化悬浮后涂片，荧光显微镜观察和计数荧光蛋白表达情况。

1.2.4 基因组和转录水平 PCR 鉴定稳定表达细胞株 使用天根生化科技有限公司的基因组 DNA 提取试剂盒分别提取稳定表达 DsRed2 和 EGFP 的 MDCK 和 HeLa 细胞的基因组 DNA，以基因组 DNA 为模板，用上述 DsRed2 和 EGFP 克隆引物进行 PCR 鉴定。使用 Invitrogen 公司的 TRIzol® Reagent 说明书提取稳定表达 DsRed2 和 EGFP 的 MDCK 和 HeLa 细胞总 RNA，然后用 TaKaRa 公司的 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 将总 RNA 反转录成 cDNA，以 cDNA 为模板，使用上述 DsRed2 和 EGFP 克隆引物进行 PCR 鉴定。

1.2.5 蛋白质水平鉴定稳定表达细胞株 提取稳定表达 DsRed2 和 EGFP 的 MDCK 和 HeLa 细胞总蛋白质，聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质，转移至硝酸纤维素膜，5% 脱脂奶粉室温封闭 2h，将膜片分别与封闭液稀释的鼠抗 GFP 单克隆抗体及鼠抗 RFP 单克隆抗体 4℃ 杂交过夜，洗膜 10min/次，3 次；然后用辣根过氧化

酶标记的山羊抗鼠 IgG 室温杂交 2h, ECL 显色, UVITEC 化学发光成像。

2 结　果

2.1 构建 pLV-2MCS-Puro 载体

连接设计合成的双基因克隆表达元件(图 1a 下划线处所示两酶切位点之间部分)和骨架载体 pLV-MSC-Puro(图 1b),挑取阳性克隆提取质粒后,从两个多克隆位点各选取一个限制性内切核酸酶切位点(*Bam*HI 和 *Sbf*I)双酶切,1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,获得了 750bp 的目的基因条带及 10kb 的载体条带(图 1c)。测序证实 pLV-2MCS-Puro 载体构建成功(图 1d)。

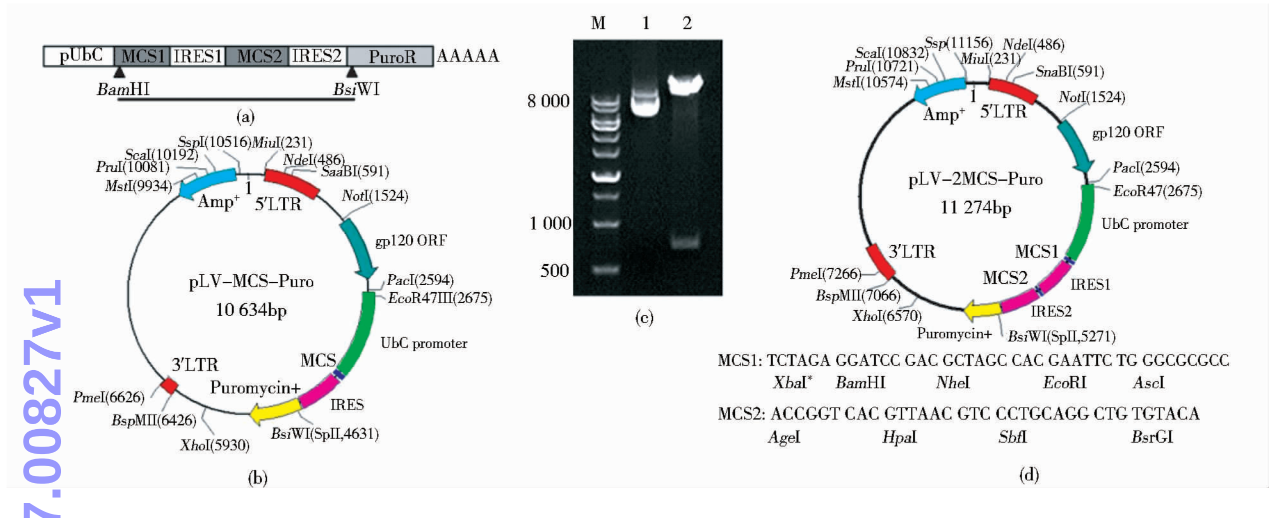


图 1　pLV-2MCS-Puro 载体构建

Fig. 1　Construction of the pLV-2MCS-Puro vector

(a) Schematic design of the bicistronic expression element　(b) Map of the pLV-MCS-Puro vector　(c) Restriction enzyme digestion of pLV-2MCS-Puro vector　M: 1kb DNA marker; 1: pLV-2MCS-Puro vector; 2: Double enzyme digestion of pLV-2MCS-Puro vector by *Bam*HI and *Sbf*I　(d) Map of the pLV-2MCS-Puro vector

2.2 pLV-DsRed2-EGFP-Puro 载体构建

将 EGFP 荧光蛋白基因先克隆到 pLV-2MCS-Puro 载体的多克隆位点 MCS2,菌落 PCR 验证得到 pLV-MCS1-EGFP-Puro(图 2a),然后将 DsRed2 荧光蛋白基因克隆到 pLV-MCS1-EGFP-Puro 的多克隆位点 MCS1,菌落 PCR 验证得到表达载体 pLV-DsRed2-EGFP-Puro (图 2b)。

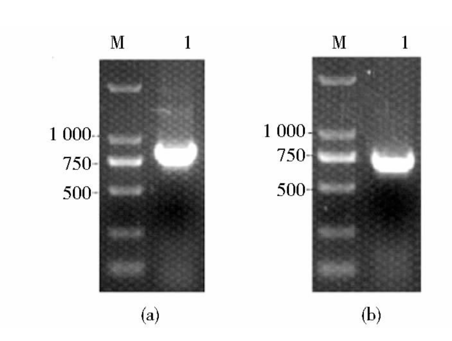


图 2　pLV-DsRed2-EGFP-Puro 载体构建

Fig. 2　Construction of the pLV-DsRed2-EGFP-Puro vector

(a) Verification of the pLV-MCS1-EGFP-Puro vector by cloning EGFP gene　(b) Verification of the pLV-DsRed2-EGFP-Puro vector by cloning DsRed2 gene; M: DL2 000 DNA marker

2.3 瞬时转染 HEK293T 细胞验证 pLV-2MCS-Puro 载体

将构建完成的 pLV-DsRed2-EGFP-Puro 载体转染爬片的 HEK293T 细胞,转染 24h 后荧光倒置显微镜用 488nm 和 559nm 激发光观察 DsRed2 和 EGFP 表达情况。可见 DsRed2 和 EGFP 能在 HEK293T 细胞中共表达,从荧光强度看具有很高的协同性,而且具有较高的转染效率(图 3)。

2.4 MDCK 和 HeLa 稳定共表达细胞筛选实验验证 pLV-2MCS-Puro 载体

嘌呤霉素耐药性预试验确定了 MDCK 和 HeLa 细胞的筛选给药浓度分别为 10μg/ml 和 2μg/ml。将重组质粒 pLV-DsRed2-EGFP-Puro 分别转染 MDCK 和 HeLa 细胞,经嘌呤霉素筛选,分别获得了具有嘌呤霉素抗性的 MDCK 和 HeLa 细胞池(pool)。去除嘌呤霉素,正常

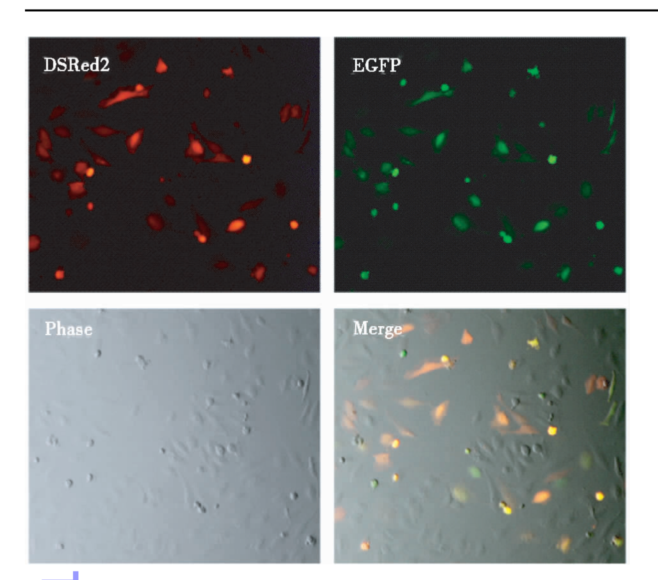


图3 荧光显微观察 pLV-DsRed2-EGFP-Puro 质粒瞬时转染 HEK293T 细胞

Fig. 3 Fluorescence micrograph of HEK293T cells that transiently transfected with pLV-DsRed2-EGFP-Puro plasmid

培养传代3个月约60代次以后,取消化处理的细胞涂片,荧光显微镜观察所获抗性细胞池的 DsRed2 和 EGFP 表达情况。结果表明所获得的 MDCK 和 HeLa 耐药细胞池的 DsRed2 和 EGFP 阳性率都接近100%。其中 MDCK 耐药细胞池两种荧光蛋白在所有细胞中亮度较为一致,且表达量均较高(图4a)。HeLa 细胞池中两种荧光蛋白表达也较为一致(图4b),但是均存在弱表达的细胞群(图5),且通过进一步提高药物浓度到5μg/ml不能去除弱表达细胞群。

2.5 稳定共表达 DsRed2 和 EGFP 的 MDCK 和 HeLa 细胞池基因组鉴定

提取传代3个月传代60代的两种耐药细胞池,提取基因组,PCR 鉴定。MDCK 和 HeLa 细胞嘌呤霉素抗性细胞的基因组 PCR 产物均包含 651bp 的 *DsRed2* 基因条带和 781bp 的 *EGFP* 基因条带以及包含 *DsRed2* 基因、一个 IRES 序列和 *EGFP* 基因的 2 200bp 的基因条带(D-I-E)(图6a)。

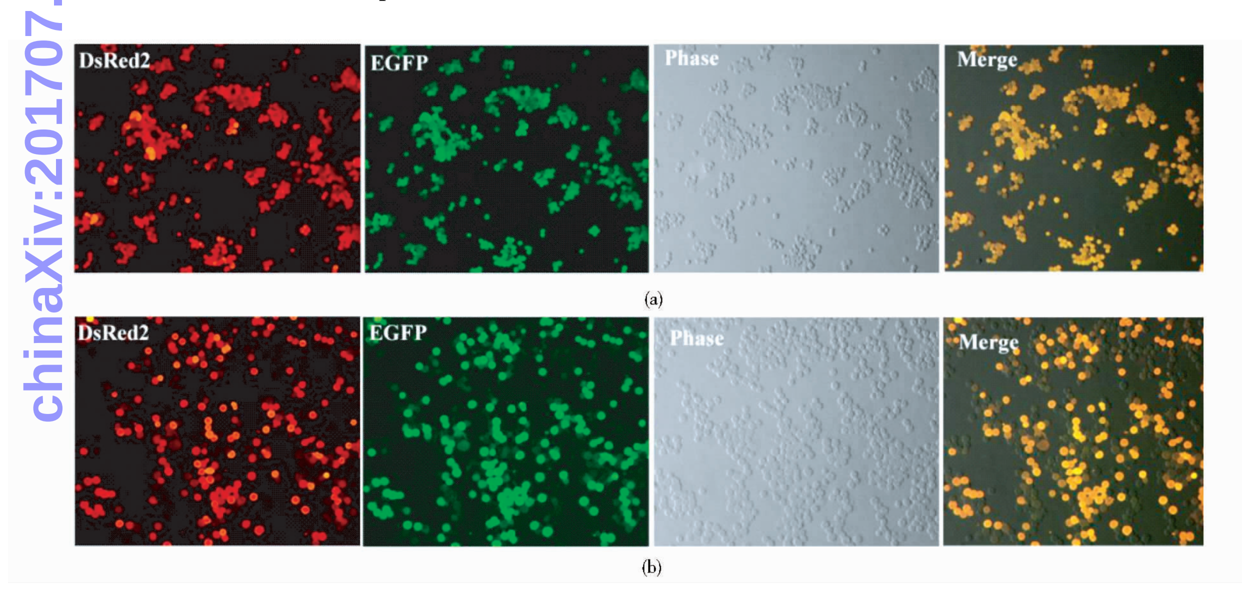


图4 转染 pLV-DsRed2-EGFP-Puro 的 MDCK 和 HeLa 耐药细胞池涂片

Fig. 4 Smear of drug-resistant MDCK and HeLa cell pools that were transfected with pLV-DsRed2-EGFP-Puro vector

(a) Drug-resistant MDCKcell pools (b) Drug-resistant HeLa cell pools.

2.6 稳定共表达 EGFP 和 DsRed2 的 MDCK 和 HeLa 细胞 RT-PCR 鉴定

提取稳定共表达 EGFP 和 DsRed2 的 MDCK 和 HeLa 细胞池总 RNA。以 cDNA 为模板 PCR 鉴定,PCR 产物均包含 651bp 的 *DsRed2* 基因条带和 781bp 的 *EGFP* 基因条带以及包含 *DsRed2* 基因、一个 IRES 序列和 EGFP 基因的 2 200bp 的基因条带(图6b)。

2.7 稳定共表达 EGFP 和 DsRed2 的 MDCK 和 HeLa 细胞蛋白质水平鉴定

提取稳定共表达 EGFP 和 DsRed2 的 MDCK 和 HeLa 细胞池总蛋白质,蛋白质免疫印迹鉴定结果表明,在所获得的两种细胞池中,EGFP 和 DsRed2 表达量较

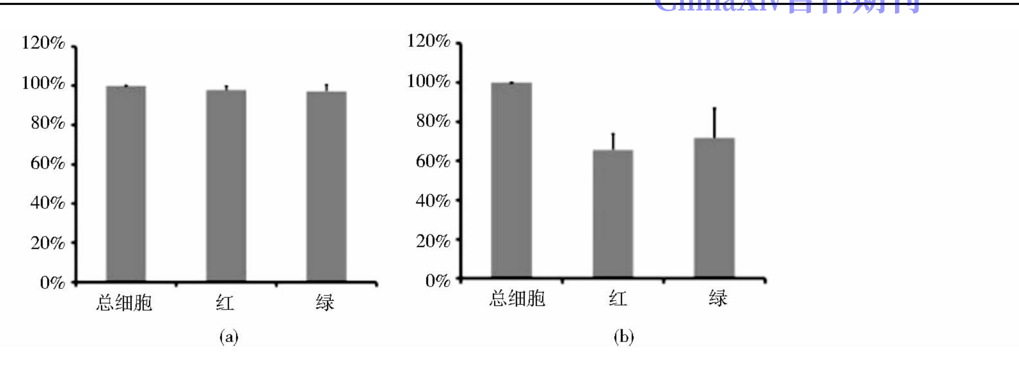


图 5　MDCK 和 HeLa 耐药细胞池高荧光亮度细胞计数统计

Fig. 5　Statistical counting of drug-resistant MDCK and HeLa cell pools with high fluorescence brightness

(a) Drug-resistant MDCK cell pools　(b) Drug-resistant HeLa cell pools

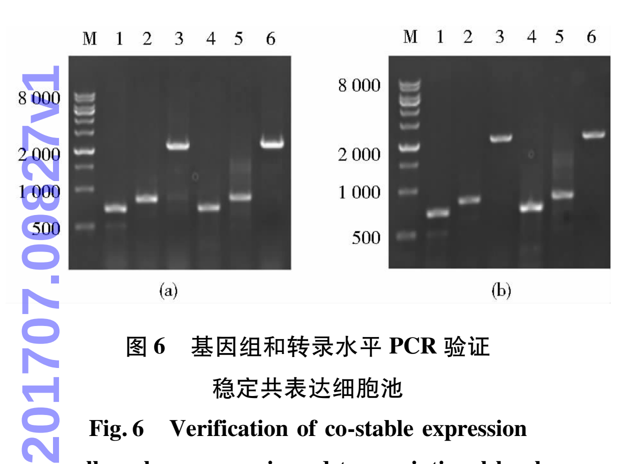


图 6　基因组和转录水平 PCR 验证稳定共表达细胞池

Fig. 6　Verification of co-stable expression cell pools on genomic and transcriptional levels

(a) Verification of co-stable expression cell pools on genomic level　(b) Verification of co-stable expression cell pools on transcriptional level　Lanes 1-3: MDCK cells; lanes 4-6: HeLa cells. The bands indicated DsRed, EGFP and D-I-E, respectively　M: 1kb DNA marker

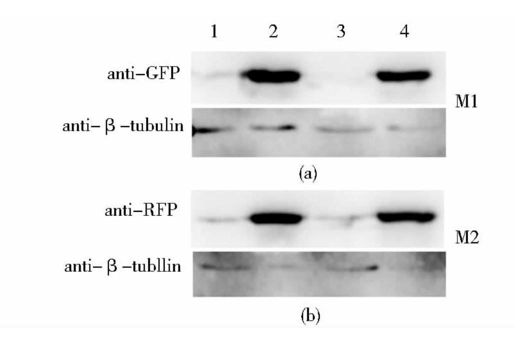


图 7　蛋白质水平验证稳定共表达细胞池 DsRed2 和 EGFP 蛋白表达量

Fig. 7　Verification of co-stable expression cell pools on protein level

(a) Anti-GFP bands and anti-β-tubulin bands　(b) Anti-RFP bands and anti-β-Tubulin bands　Anti-GFP bands and anti-RFP bands: exposure 10s, anti-β-Tubulin bands: exposure 2min. Lanes 1-4: Parental MDCK cells, drug-resistant MDCK cell pools, Parental HeLa cells, drug-resistant HeLa cell pools; M1: Membrane1; M2: Membrane2

为一致(图 7)。

3　讨　论

科研和细胞工程领域获得两个基因的共表达可以通过共转染两个表达质粒的方法实现,然而限于两个载体的转染和表达效率差异以及不稳定性,在效率和成本等方面带来一系列问题。要克服转染效率的差异,可以将两个基因克隆到同一个载体表达,目前主要有以下方式:①在同一个载体,由不同的启动子启动表达两个基因[19];②两个基因之间插入剪切位点,应用选择性剪切机制表达两个基因[20-22];③基因之间以切割靶点序列连接,如 2A 肽[23-25]或者 intein[26-27]序列链接两个蛋白质;④两个蛋白质编码序列之间插入内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)。文献报道,IRES 介导的双基因共表达系统在表达效率上相较前三者具有明显的优势[19, 28-29]。

在科研和细胞工程领域经常需要筛选稳定表达细胞株,尤其是双基因共表达细胞株构建,实质上是要实现两个目的基因和筛选标记基因至少三个基因的共表达,更是增加了筛选的难度。本文基于 IRES 序列构建了一个多基因共表达载体,含有两个多克隆位点,串联表达 2 个目的基因以及筛选标记基因。由一个高效启动子启动目的基因和筛选标记基因转录为一个转录本,而且筛选标记基因位于转录本的 3′端,位于两个外源基因读码框的下游,原理上筛选到的抗性细胞克隆都能够共同表达目的基因。

本文以 DsRed2 和 EGFP 荧光蛋白为模型,利用载体 pLV-2MCS-Puro,筛选得到了 MDCK 和 HeLa 两种抗性细胞池,得到抗性细胞池以后,取出筛选压力,传代 3 个月约 60 代次。荧光显微观察表明,两种细胞均稳定表达两种荧光蛋白,双阳性率接近 100%。荧光细胞计数表明,MDCK 细胞池几乎全部细胞都能同时表达两种荧光蛋白且呈现较强而且一致的荧光亮度;HeLa 细胞池中两种荧光蛋白亮度也高度一致,但存在荧光强弱两种细胞群,强荧光强度细胞约占总细胞的 75% 以上,提高筛选压力不能去除弱表达的细胞群,可能是因为基因组整合位点差异。但是处于第二个多克隆位点依靠 IRES 起始翻译的 EGFP 蛋白高荧光亮度细胞数甚至略高于 DsRed2 荧光高亮度细胞数,表明该载体分别以 5′帽式和 IRES 分别启动两个蛋白质以大体一致的效率翻译表达。通过基因组和转录水平的 PCR 验证,都证明目的基因稳定整合到了细胞的基因组上,而且两个目的基因以一个共同的转录本转录。蛋白质免疫印迹鉴定验证,在所获得的两种细胞池中,EGFP 和 DsRed2 表达量较为一致。另外,据文献报道 MDCK 细胞转染效率不高,只有 4% 左右[30],与我们的转染实验结果基本一致,如此低的转染效率能够成功筛选到稳定表达细胞株也表明该载体具有高效的筛选效率。

该载体在多基因共表达或稳定共表达细胞株筛选方面具有一定的应用前景。以单克隆抗体药物为例,单抗药物已经达到了千亿美元的市场规模,在单抗药物研发的过程中,种子细胞的构建是关键环节之一。抗体是由轻重链构成的同源四聚体,种子细胞筛选的过程中需要同时转染轻链和重链两个表达基因,转染,整合,表达效率的一致性和基因整合后的稳定性制约了种子细胞筛选的成功率和效率,影响抗体药物研发环节的时间,以及人力、物力、成本。本文构建的载体为此提供了一种选择。另外载体是以慢病毒表达载体为骨架改造的,未来的应用中可以用于慢病毒包装进一步提高一些难转染细胞的转染效率。同时在抗性筛选标记的选择上也具有比较大选择空间。

4 结 论

本文成功构建了一个基于 IRES 介导的多基因共表达载体 pLV-2MCS-Puro。利用 IRES 可以有效地介导双外源基因和抗性基因共表达。在 MDCK 和 HeLa 两种转染效率差别较大的细胞中实现了高效的筛选效率,而且连续传代证明以该载体筛选到的稳转株细胞稳定性较好。该载体在将来科学研究中瞬时共表达两个基因,或者抗体工程和细胞工程领域构建稳定表达种子细胞等方面都具有比较好的应用前景。

参考文献

[1] Allera-Moreau C, Chomarat P, Audinot V, et al. The use of IRES-based bicistronic vectors allows the stable expression of recombinant G-protein coupled receptors such as NPY5 and histamine 4. Biochimie, 2006, 88(6):737-746.

[2] Pelletier J, Sonenberg N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. Nature, 1988, 334(6180):320-325.

[3] Jang S K, Krausslich H G, Nicklin M J, et al. A segment of the 5′ nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during *in vitro* translation. Journal of Virology, 1988, 62(8):2636-2643.

[4] Lewis S M, Holcik M. For IRES trans-acting factors, it is all about location. Oncogene, 2008, 27(8):1033-1035.

[5] Lu J, Zhang J, Lin M, et al. IRES: translation element of RNA viruses. Chinese Journal of Biochemistry & Molecular Biology, 2007, 27(03):513-518.

[6] Jackson R J, Hellen C U, Pestova T V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. Nature Reviews. Molecular Cell Biology, 2010, 11(2):113-127.

[7] Chappell S A, Edelman G M, Mauro V P. Ribosomal tethering and clustering as mechanisms for translation initiation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(48):18077-18082.

[8] Shatsky I N, Dmitriev S E, Terenin I M, et al. Cap- and IRES-independent scanning mechanism of translation initiation as an alternative to the concept of cellular IRESs. Molecules and Cells, 2010, 30(4):285-293.

[9] Komar A A, Hatzoglou M. Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: mystery of their existence. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(25):23425-23428.

[10] Misteli T, Spector D L. Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. Nature Biotechnology, 1997, 15(10):961-964.

[11] Fussenegger M, Moser S, Bailey J E. pQuattro vectors allow one-step multigene metabolic engineering and auto-selection of quattrocistronic artificial mammalian operons. Cytotechnology, 1998, 28(1-3):229-235.

[12] Martinez-Salas E, Lopez de Quinto S, Ramos R, et al. IRES elements: features of the RNA structure contributing to their activity. Biochimie, 2002, 84(8):755-763.

[13] Martinez-Salas E. Internal ribosome entry site biology and its use in expression vectors. Current Opinion in Biotechnology, 1999, 10(5):458-464.

[14] Liu X, Constantinescu S N, Sun Y, et al. Generation of mammalian cells stably expressing multiple genes at predetermined levels. Analytical Biochemistry, 2000, 280(1):20-28.

[15] Murakami M, Watanabe H, Niikura Y, et al. High-level expression of exogenous genes by replication-competent retrovirus vectors with an internal ribosomal entry site. Gene, 1997, 202(1-2):23-29.

[16] Rayssac A, Neveu C, Pucelle M, et al. IRES-based vector coexpressing FGF2 and Cyr61 provides synergistic and safe therapeutics of lower limb ischemia. Molecular Therapy, 2009, 17(12):2010-2019.

[17] Jazwa A, Tomczyk M, Taha H M, et al. Arteriogenic therapy based on simultaneous delivery of VEGF-A and FGF4 genes improves the recovery from acute limb ischemia. Vasc Cell, 2013, 5(1):13.

[18] Zhang C, Wang K Z, Qiang H, et al. Angiopoiesis and bone regeneration via co-expression of the hVEGF and hBMP genes from an adeno-associated viral vector *in vitro* and in vivo. Acta Pharmacologica Sinica, 2010, 31(7):821-830.

[19] Ngoi S M, Chien A C, Lee C G. Exploiting internal ribosome entry sites in gene therapy vector design. Current Gene Therapy, 2004, 4(1):15-31.

[20] Cepko C L, Roberts B E, Mulligan R C. Construction and applications of a highly transmissible murine retrovirus shuttle vector. Cell, 1984, 37(3):1053-1062.

[21] Korman A J, Frantz J D, Strominger J L, et al. Expression of human class II major histocompatibility complex antigens using retrovirus vectors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987, 84(8):2150-2154.

[22] Fallot S, Ben Naya R, Hieblot C, et al. Alternative-splicing-based bicistronic vectors for ratio-controlled protein expression and application to recombinant antibody production. Nucleic Acids Research, 2009, 37(20):e134.

[23] Doronina V A, Wu C, de Felipe P, et al. Site-specific release of nascent chains from ribosomes at a sense codon. Molecular and Cellular Biology, 2008, 28(13):4227-4239.

[24] de Felipe P, Luke G A, Hughes L E, et al. E unum pluribus: multiple proteins from a self-processing polyprotein. Trends in Biotechnology, 2006, 24(2):68-75.

[25] Bosch M K, Nerbonne J M, Ornitz D M. Dual transgene expression in murine cerebellar *Purkinje neurons* by viral transduction *in vivo*. PLoS ONE, 2014, 9(8):e104062.

[26] Saleh L, Perler F B. Protein splicing in cis and in trans. The Chemical Record, 2006, 6(4):183-193.

[27] Eryilmaz E, Shah N H, Muir T W, et al. Structural and dynamical features of inteins and implications on protein splicing. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(21):14506-14511.

[28] Renaud-Gabardos E, Hantelys F, Morfoisse F, et al. Internal ribosome entry site-based vectors for combined gene therapy. World Journal of Experimental Medicine, 2015, 5(1):11-20.

[29] Alleramoreau C, Dellucclavières A, Castano C, et al. Long term expression of bicistronic vector driven by the FGF-1 IRES in mouse muscle. BMC Biotechnology, 2007, 7(1):1-12.

[30] Chu C, Lugovtsev V, Golding H, et al. Conversion of MDCK cell line to suspension culture by transfecting with human siat7e gene and its application for influenza virus production. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(35):14802-14807.

Construction of the IRES-based Vector for Multiple Gene Co-expression

TIAN Cong-hui[1] XIE Xue-mei[1] LI Ying[1] YIN Xiao-dong[2] HAN Jun[1] LI Jun[1]

(1 School of Pharmacy of Liaocheng University, Institute of BioPharmaceutical Research, Liaocheng 252000, China)

(2 Yixing Cell Biotechnology Limited Company, Yixing 214200, China)

Abstract Objective: An IRES-based vector was constructed to achieve co-expression of two target genes with the screening marker gene promoted by the single promoter, and to improve the screening efficiency of multiple genes co-stable expression cell lines. Methods: A bicistronic expression element *Bam*HI-MCS1-IRES-MCS2-IRES-*Bsi*WI which has two multiple cloning sites was designed and synthesized. The vector named pLV-2MCS-Puro was constructed by inserting the element into the skeleton vector pLV-MCS-Puro which was

constructed previously in lab. The *DsRed2* and *EGFP* genes were inserted simultaneously into the vector to test the screening efficiency of multiple genes co-stable expression cell lines. Results: The vector pLV-2MCS-Puro and the recombinant plasmid pLV-DsRed2-EGFP-Puro were constructed successfully. Transient transfection experiment showed that the vector can mediate co-expression of multiple genes. MDCK and HeLa cell pools resistant to puromycin were obtained through transfection of the recombinant plasmid. The fluorescent inverted microscope showed that *DsRed2* gene at the upstream of the IRES sequence and EGFP gene at the downstream of IRES sequence were co-expressed in cells, and the double positive rate was close to 100%. It indicated that this vector has high screening efficiency. The results of genomic PCR, RT-PCR and Western blot showed that *DsRed2* and *EGFP* genes were stably integrated into cell genome and the two proteins were expressed consistently. Conclusion: The IRES-based vector pLV-2MCS-Puro was successfully constructed and proved to be efficiently in screening multiple genes co-stable expression cell lines. This vector will have certain application prospects in studying protein interactions and constructing engineering cell lines.

Key words IRES Vector construction Gene coexpression